Aus dem Pharmakologischen Institut der
Freien Universität Berlin

UNTERSUCHUNGEN ÜBER TERATOGENE WIRKUNGEN MEHRERER SIMULTAN APPLIZIERTER PHARMAKA BEI MÄUSEN

Dissertation
zur Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Zens
Bonn

1975

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Freien Universität Berlin

UNTERSUCHUNGEN ÜBER TERATOGENE WIRKUNGEN MEHRERER SIMULTAN APPLIZIERTER PHARMAKA BEI MÄUSEN

Dissertation
zur Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Zens
Bonn

Referent: Prof. Dr. med. D. Neubert

Korreferent: Prof. Dr. E. Knoll-Köhler

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Freien
Universität Berlin

Promoviert am: 17. Nov. 1975

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

B. Grundsatzfragen der Pränataltoxikologie und Pharmaka-Kombinationen

I. Definitionen von Wirkungen in der Pränataltoxikologie
II. Pharmaka-Kombinationen und deren gegenseitige Beeinflussung

C. Einfluß der getesteten Pharmaka auf das embryonale und fetale Wachstum

Allgemeine Bemerkungen über
I. 6-Aminonicotinamid (6-AN)
II. 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)
III. 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T)
IV. Cyclophosphamid
V. Dexamethason

D. Experimenteller Teil
(Material und Methoden)

I. Versuchsanordnungen
II. Getestete Substanzen
III. 1) Versuchstiere und Tierhaltung
2) Applikation verschiedener Teratogene
3) Untersuchung der Tiere und Auswertung
IV. Statistische Auswertung
1) Signifikanzen
2) Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Relation ("Schwellen-Dosis")

E. Versuchsergebnisse und Diskussion

I. Untersuchung der einzelnen Teratogene in Bezug auf:
   1) Phasenspezifität
   2) Dosis-Wirkungsrelation
   3) Gaumenspaltenhäufigkeit
   4) Feuchtgewichtsänderungen
   5) Resorptionserscheinungen

   a) 6-Aminonicotinamid (6-AN)
   b) 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)
   c) 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T)
   d) Cyclophosphamid
   e) Dexamethason

II. Kombinationsversuche mit jeweils drei, vier und fünf Teratogenen

III. Diskussion der Versuchsergebnisse

F. Zusammenfassung

G. Literatur

A. Einführung

Trotz vieler wissenschaftlich-pharmakologischer Untersuchungen steht die Forschung in der Embryonal-Toxikologie auch heute noch weit hintenan, und teratogene und andere embryotoxische Auswirkungen von in Nahrungsmitteln, Pharmaka und Chemikalien enthaltenen Substanzen sind durchaus noch nicht völlig zu übersehen und zu erklären.

Wenn man auch einzelne Pharmaka auf ihre teratogene Wirkung hin untersucht hat und von ihnen weiß, daß sie, einzeln gegeben, auch in hohen Dosen oft keine Wirkung auf den embryonalen Organismus haben, so fehlen doch weitgehend Untersuchungen über die teratogenen Folgen mehrerer kombinierter Pharmaka, so wie sie in der Medizin, in der Nahrungsmittel-Chemie, in Chemikalien der Landwirtschaft, usw. verwendet werden.

Ziel unserer Untersuchungen war daher, nach genauer Testung der einzelnen Substanzen teratogene und andere embryotoxische Wirkungen mehrerer simultan applizierter Pharmaka festzustellen und zu prüfen, wie sich die Teratogene unter diesen Bedingungen gegenseitig beeinflussen.

Als Indikatoren für die embryotoxischen Effekte waren für uns maßgebend Gaumenspaltenhäufigkeit, Feuchtgewichtsänderungen und Resorptionserscheinungen.

B. Grundsatzfragen der Pränataltoxikologie und Pharmaka-Kombinationen

I. Definitionen der Pränataltoxikologie

Da die in der Pränataltoxikologie tätigen Forscher bisher den pharmakologischen Gesichtspunkten sekundäre Bedeutung beimaßen, gibt es noch keine allgemein gültige Nomenklatur, was oft zu Mißverständnissen und Verwirrungen führte.

Darum wird in dieser Arbeit eine Nomenklatur benutzt, die mit den bei toxikologischen Untersuchungen verwendeten Ausdrücken übereinstimmt und die die speziellen Gegebenheiten der Pränataltoxikologie berücksichtigt.
Folgende Begriffe seien hier zum besseren Verständnis definiert:

Embryotoxischer (fetotoxischer) Effekt	=	umfaßt als Überbegriff alle toxischen Einflüsse auf Embryo oder Fet, ungeachtet der Art, der Dauer und der Folgen dieser Einflüsse
Embryoletaler (fetolet.) Effekt od. Embryomortalität (Fetomortalität)	=	ist ein näher definierter embryotoxischer Effekt. Man bezeichnet damit das Absterben des Keimes in jedem Stadium der embryonalen oder fetalen Entwicklung.

Teratogener Effekt = ist ein weitgehend irreversibler embryotoxischer Effekt im Sinne einer Mißbildung, hervorgerufen durch die Störung eines bestimmten embryonalen oder fetalen Entwicklungsvorgangs (Induktion, Differenzierung). Die Mißbildung kann makroskopisch erkennbar sein, oder aber als mikromorphologischer Defekt oder als funktionelle Störung auftreten.

Beispiele für embryotoxische, aber nicht teratogene, Effekte würden sein: allgemeine Retardierung des embryonalen oder fetalen Wachstums, reversible verspätete Ausbildung bestimmter Ossifikationszentren, fetale Intestinalblutungen (ohne Spätfolgen), u.ä.

Als teratogene Effekte würde man dann z.B. auch irreversible Schäden am lymphatischen Gewebe des Feten (mit Spätfolgen) oder geistige Schäden aufgrund gestörter pränataler Entwicklung des Gehirns bezeichnen.

II. Pharmaka-Kombinationen und die gegenseitige Beeinflussung von Pharmaka

Wie bereits erwähnt, haben wir als Hauptziel unserer Untersuchungen die Kombination mehrerer Pharmaka angesehen, weil über die embryotoxischen Wirkungen und die Art der gegenseitigen Beein-

flussung der Teratogene bisher wenig bekannt ist.

Mehrere Pharmaka, gleichzeitig gegeben, können sich gegenseitig verstärken, abschwächen, oder es kann sogar eine neue, nicht ohne weiteres vorhersehbare, Wirkung resultieren. Bei einer Wirkungsverstärkung kann man zwischen einer Addition und Potenzierung unterscheiden. Wobei Addition hier nicht als einfache Summierung mehrerer Effektwerte, sondern als Zusammenzählen der prozentualen Effektwerte (Effekt = 0 - 100 %) entsprechend dem Verlauf der Dosis-Wirkungskurve zu verstehen ist.
Von einer Potenzierung spricht man, wenn man einen überadditiven Effekt erzielt, das heißt wenn nach Kombination zweier oder mehrerer Substanzen ein weit stärkerer Effekt auftritt, als nach dem Verlauf der Dosis-Wirkungskurven erwartet werden kann.

C. Einfluß der getesteten Pharmaka auf die embryonale und fetale Entwicklung

Allgemeine Bemerkungen über

I. 6-Aminonicotinamid (6-AN)

6-AN, das strukturell dem Nicotinsäureamid ähnelt, hat man zeitweilig als Antimetabolit zur Behandlung von malignen Tumoren verwendet, davon aber wegen seiner hohen Toxizität wieder abgesehen.

6-AN bildet im Körper 6-ANAD und 6-ANADP. COPER und NEUBERT fanden 1964, daß diese atypischen Pyridinnucleotide als kompetitive Hemmstoffe auf NAD- und NADP-abhängige Enzyme wirken, und 1968 beschrieben NEUBERT und KÖHLER eine mögliche Blockierung des Pentose-Phosphat-Zyklus im embryonalen Gewebe durch 6-AN.

HERKEN et al. (1969, 1970) stellten nach Behandlung mit 6-AN eine Anhäufung von 6-Phosphogluconat im Gehirn von erwachsenen Ratten fest. KÖHLER et al. (1970) sowie BARRACH (1970, 1973) konnten zeigen, daß 6-ANADP kompetitiv die 6-PGD im embryonalen Gewebe hemmt und wohl so embryotoxisch wirkt.
Eine erhöhte Gaumenspaltenhäufigkeit bei Feten von mit 6-AN behandelten Muttertieren wurde von CHAMBERLAIN (1966) beschrieben und seither vielfach bestätigt.

II. 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)

TCDD, eine der giftigsten Substanzen, die man kennt, spielte in unseren Versuchen eine wichtige Rolle, weil es als Verunreinigung in dem in der Landwirtschaft weit verbreiteten Herbizid 2,4,5-T vorkommt. Es entsteht bei der Herstellung von 2,4,5-T aus Trichlorphenol unter Einwirkung von Hitze und Druck und ist je nach Herstellungsbedingungen mehr oder weniger stark im 2,4,5-T enthalten.

Durch die daraus sich ergebende Möglichkeit der Kontamination des menschlichen Organismus ist es wichtig zu wissen, wie TCDD, auch mit anderen Pharmaka zusammen, auf den Säugetierorganismus, hier speziell auf die embryonale und fetale Entwicklung, einwirkt.

Bisher weiß man, daß TCDD als teratogene Effekte Gaumenspalten und Nierenmißbildungen bei Mäuse-Feten hervorruft (COURTNEY und MOORE, 1971, NEUBERT und DILLMANN, 1972). Weiter wurden Augenmißbildungen und Gewichtsreduktionen bei Hamsterfeten, Intestinal-Blutungen bei Rattenfeten, Fettinfiltrationen in der fetalen Leber, subcutane Ödeme und Ossifikationshemmungen festgestellt. Dagegen ist es nicht gelungen, durch Applikation von TCDD Mißbildungen an Extremitäten, Rumpf und Schädelknochen hervorzurufen. Stärkere Dosen führen zu einem allgemein toxischen Effekt in dem embryonalen Gewebe und vermehrt zu Fetensterblichkeit. Dabei kann bis jetzt auch eine toxische Einwirkung auf das

mütterliche Gewebe nicht ausgeschlossen werden.

III. 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T)

Dem seit Ende der vierziger Jahre in der Land- und Forstwirtschaft verwendeten Herbizid 2,4,5-T wurde in den letzten Jahren vermehrt Beachtung geschenkt, seit 1970 von COURTNEY et al. eine deutliche Erhöhung der Mißbildungsrate (Gaumenspalten) bei Mäuse- und Rattenfeten festgestellt wurde.
Über das Auftreten der sogenannten "Chloracne" (Pernakrankheit) bei Arbeitern, die mit der Herstellung der Substanz beschäftigt waren, sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden (TELEKY, 1926; HOFMANN, 1957; POLAND et al., 1971; KIMBROUGH, 1972).

ROLL untersuchte 1971 die Wirkung von 2,4,5-T auf Mäusefeten und bemerkte eine dosisabhängige Mißbildungsrate in Form von Gaumenspalten und erhöhte Fetomortalität nach Applikation extrem hoher Dosen.

Da in den im Handel befindlichen Präparaten manchmal bis zu 30 ppm TCDD enthalten ist, machte man zunächst dieses hochtoxische Dioxin für die Mißbildungen verantwortlich - was sicher auch seine Berechtigung hat. Anhand von Versuchen mit reinem 2,4,5-T und solchem mit einem Dioxingehalt von $<0{,}05$ ppm an Mäusen, die die gleichen dosisabhängigen Mißbildungen aufwiesen, kann man doch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine embryotoxische Wirkung des

2,4,5-T selbst schließen (NEUBERT et al., 1973). Interessant ist in diesem Zusammenhang die hohe Spezies- und Stammesspezifität in Bezug auf die Wirkung. So erwies sich die Maus als viel sensibler als die Ratte, und unter den Mäusen zeigte sich u.a. der NMRI-Stamm, der von uns benutzte Stamm, als empfindlich.

IV. Cyclophosphamid (Endoxan^{R})

Cyclophosphamid = N,N-Bis-(ß-chloräthyl)-N,O-propylen-phosphorsäureesterdiamid ist ein Cytostatikum aus der Gruppe der alkylierenden Substanzen und wird als solches in der Klinik zur Therapie bestimmter Neoplasien verwendet. Seine teratogenen Wirkungen sind im Tierexperiment seit längerer Zeit bekannt.

V. Dexamethason (Fortecortin^{R})

Glucocorticoide werden heute zur Therapie der verschiedensten allergischen und rheumatischen Krankheiten benutzt. Dexamethason hat eine ca. 25mal so starke Wirkung wie das Nebennierenrindenhormon Hydrocortison. Doch neben vielen Therapieerfolgen sind auch viele Nebenwirkungen bekannt, von denen Ulcus-Bildung, verzögerte Wundheilung und erhöhte Infektbereitschaft nur eine Auswahl darstellen.

Für uns war Dexamethason deshalb von Interesse, weil FRASER 1954 schon beschrieb, daß

er nach Gabe höherer Dosen von Glucocorticoiden an schwangere A/Jax-Mause eine Gaumenspaltenhäufigkeit der Feten bis zu 1oo% erzielte. Glucocorticoide hemmen die Entwicklung des sekundären Gaumens derart, daß es zu keiner Verbindung der beiden Gaumenplatten kommen kann (WALKER and FRASER, 1956, 1957).

D. Experimenteller Teil

(Material und Methoden)

I. Versuchsanordnungen

Um embryotoxische Wirkungen mehrerer Pharmaka zu untersuchen, kann man verschiedene Methoden anwenden:

1) Alle Pharmaka werden simultan über einen längeren Zeitraum gegeben.
Der Vorteil der Methode liegt darin, daß jede Substanz während ihrer optimalen Entwicklungsphase wirksam werden kann.
Als Nachteil könnten sich dann sekundäre oder weniger interessante Effekte außerhalb der Optimalphase auf die eigentlichen Versuchsergebnisse auswirken.

2) Alle Pharmaka werden simultan nur ein einziges Mal appliziert.
Das schafft zwar die Möglichkeit, den Wirkungsmechanismus besser zu beobachten, hat aber den Nachteil, daß einzelne Pharmaka nicht in ihrer Optimalphase wirken können.

3) Alle Pharmaka werden nur einmal, aber zu verschiedenen Zeiten, jedes in seiner spezifischen, optimalen Wirkungsphase appliziert.

Um die Wirkung einer Pharmakon-Kombination genau zu analysieren, muß man letztlich alle drei Methoden anwenden, denn jede hat ihre Vor- und Nachteile.

Hier in dieser Arbeit wurde ausschließlich die zweite Methode angewandt.

Wichtigste Voraussetzung für Kombinationsversuche ist die genaue Kenntnis der Wirkungsweise der einzelnen Substanzen.
Besondere Beachtung erfordern dabei folgende Kriterien:

1) Es muß die "Schwellen-Dosis" jeder einzelnen Substanz bekannt sein.

2) Verlauf und Steilheit der Dosis-Wirkungskurve sind wichtig.

3) Es muß ein Zeitpunkt der Wirkung (Schwangerschaftstag) festgesetzt werden, an dem alle Substanzen noch einen ausreichenden Effekt zeigen.

II. Getestete Substanzen

1) Reines TCDD (Mat.Nr. 651/142-26) wurde uns von der DOW Chemical Co., Midland, Michigan, USA, zur Verfügung gestellt. Der Reinheitsgrad (gaschromatografische Analyse) wurde mit 98,6 % angegeben.
Die Substanz wurde in Aceton bzw. Chloroform gelöst, mit Rapsöl vermischt und den Mäusen in Dosen von 0,1 ml/10 g KG durch die Magensonde verabreicht.

2) Reines 2,4,5-T (Mat. SHG) erhielten wir von C.H. BOEHRINGER, Ingelheim, BRD. Der Dioxingehalt wurde mit <0,02 ppm angegeben, und man kann es aufgrund seines besonderen Herstellungsverfahrens als dioxinfrei ansehen.

Nach Lösen in Rapsöl (Erwärmen auf 40°C) wurde 2,4,5-T den Mäusen durch die Magensonde gegeben.

3) 6-AN wurde von Calbiochem, USA, bezogen und s.c. injiziert.

4) Dexamethason (Fortecortin^{R}) stellte uns E.MERCK, Darmstadt, BRD, zur Verfügung. Es wurde den Mäusen in wäßriger Lösung s.c. injiziert.

5) Reines Cyclophosphamid (Endoxan^{R}) stellten die ASTA-Werke, Brackwede, BRD, zur Verfügung. Es wurde ebenfalls in wäßriger Lösung s.c. injiziert.

III. 1) Versuchstiere und Tierhaltung

Für alle Versuche wurden Mäuse vom Stamm NMRI (von Schwenke & Co., Bad Nauheim, BRD) mit einem Gewicht von 29 ± 3 g verwendet. Als Futter wurden Altromin R und Leitungswasser ad lib. gegeben. Es herrschte eine konstante Raumtemperatur von 21-23°C. Die Tiere wurden in einem Zeitraum von zwei Stunden gepaart, je 20 weibliche mit 10 männlichen Tieren. Der anhand von Vaginalpfröpfen ermittelte Tag der Begattung wurde als Tag 0 der Schwangerschaft bezeichnet.

2) Untersuchung der Tiere und Auswertung

Die Muttertiere wurden am Tag 18 der Schwangerschaft getötet, die Feten sofort heraus-

präpariert und gewogen.
Resorbierte Feten wurden als tot gezählt. Würfe mit weniger als fünf Implantationen wurden nicht mitgewertet. Die durchschnittliche Zahl der Implantationen betrug bei diesem Stamm 11,1 ± 1,3.

Die Feten wurden nach dem Wiegen in 4%iger Formalinlösung fixiert. Nach etwa einwöchiger Fixierzeit wurde der obere Teil des Kopfes mit dem Oberkiefer durch den WILSON-Schnitt Nr. 1 vom übrigen Körper getrennt. Dieser Schnitt (Schnittebene durch Mundwinkel und Ohren) ermöglicht eine genaue Betrachtung des Gaumens. Bei einem Teil der Feten wurde der Knochen nach "Aufhellung" in KOH und Anfärben mit Alizarin dargestellt.

IV. Statistische Auswertung

1) Signifikanzen

Die Ergebnisse dieser Arbeit gründen sich auf die Untersuchung von ca. 7oo behandelten schwangeren Mäusen (mit ca. 8ooo Feten) und ca. 2oo Kontrolltieren (mit ca. 2ooo Feten). Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des χ^2-Verfahrens berechnet.
Signifikanter Unterschied: $\chi^2 = 3{,}8 - 6{,}6$
$p = 0{,}01 - 0{,}05$
Hochsignifikanter Unterschied: $\chi^2 > 6{,}6$
$p < 0{,}01$
Die Mißbildungsrate wurde hier überwiegend in Prozent aller lebenden Feten ausgegeben.

Obwohl der Wurf bei statistischen Auswertungen eine experimentelle Einheit darstellen sollte, halten wir unsere Art der Auswertung jedoch für gerechtfertigt, da sich bei unseren und früheren Untersuchungen (NEUBERT und DILLMANN, 1972) eine statistische Verteilung embryotoxischer Effekte gezeigt hat. Zur genauen Analyse der Versuchsergebnisse ist aber auch die Mißbildungsrate pro einzelnem Wurf (M $\pm$ S.D.) und pro Schwangerschaft in Prozent angegeben.

2) Grafische Darstellung der Dosis-Wirkungsrelation ("Schwellendosis")

Die Abhängigkeit der Wirkung von der Dosis eines Pharmakon ist eine jeder Substanz charakteristische Funktion, die in der Dosis-Wirkungskurve grafisch dargestellt werden kann. Es empfiehlt sich auf der Abszisse das Antragen der Dosis in logarithmischem Maßstab, um auch extrem hohe und niedrige Werte anschaulich einzeichnen zu können. An die Ordinate werden die Reaktionen in Prozent des Maximaleffektes angetragen. Noch besser ist hier die Streckung der Extremwerte über die "Probit"-Skala, die es ermöglicht, die Dosis-Wirkungsrelation nahezu als Gerade einzutragen, für die dann ein bestimmter Steigungswert ermittelt werden kann.
"Probit" (= probability unit) drückt den Effekt als Funktion der Standard-Abweichung aus und ist definiert als:

$$y + 5$$
$$y = \frac{x - \bar{x}}{s}$$

x = log der effektiven Dosis
$\bar{x}$ = Mittelwert der einzelnen effektiven Dosen in einer normal verteilten Population
s = Standard-Abweichung

Die den Prozentwerten eines Effektes entsprechenden Probit-Werte sind einer Tabelle von BATSON (1960) entnommen.

Für uns besonders wichtig ist der Teil der Kurve, an dem die Werte in die Spontanrate münden - der sogenannte "Schwellenwert". Obwohl es eine "Schwellen-Dosis" streng genommen nicht gibt - man könnte den "Schwellen"-Bereich mit drastischer Erhöhung der Versuchszahlen und -tiere noch näher untersuchen und einengen - benutzen wir diese Bezeichnung dennoch, um einen klaren Bezugspunkt bei der Auswertung zu haben. Die "Schwellen-Dosis" sei definiert als die Dosis, die unter unseren Versuchsbedingungen gerade keinen signifikanten Anstieg der Mißbildungsrate über den Kontrollwert ergibt.

In unseren Untersuchungen liegt die Spontanrate bei 0,6 % - ermittelt aus ca. 2000 Feten der Kontrolltiere -, die "Schwellen-Dosis" wurde bei einer Mißbildungsrate von 1,5 % bei der Auswertung von 300 - 400 Feten behandelter Muttertiere ermittelt.

E. Versuchsergebnisse und Diskussion

I. Untersuchung der Teratogene in Bezug auf:

Um die Pharmaka einheitlich vergleichen zu können, waren für unsere Untersuchungen folgende Kriterien maßgebend:

1) Die Phasenspezifität, das heißt die Ermittlung des empfindlichsten Fetalstadiums. Wir mußten für die Kombinationsversuche einen einheitlichen optimalen Zeitpunkt der Applikation finden. Aus den Untersuchungen ergab sich der Tag 13 der Schwangerschaft als der günstigste Tag.

2) Die Dosis-Wirkungsrelation kommt am besten in der Abb. 1 zum Ausdruck, in der die jeweiligen Dosen in Beziehung zu den entsprechenden Mißbildungen (Gaumenspalten) gesetzt werden.

3) Gaumenspaltenrate,
4) Feuchtgewichtsänderungen und
5) Resorptionserscheinungen waren für uns die Indikatoren der embryotoxischen Wirkungen. Genaue Werte über Gaumenspaltenhäufigkeit sind der Dissertation von ROTHENWALLNER (1974) zu entnehmen.

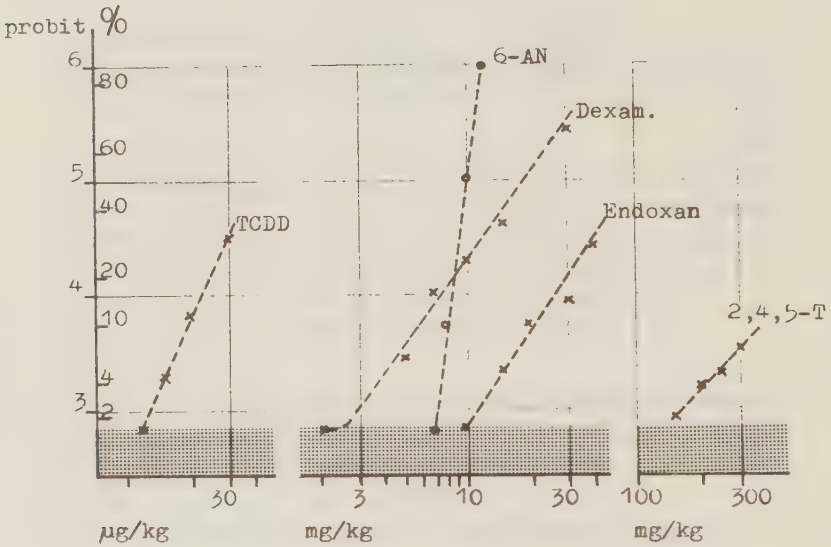
Tabelle 1: Dosis-Wirkungsrelation von fünf Teratogenen [a]

Substanzen	tan α der Dosis-Wirkungskurve	Quotient aus probit 5- u. probit 3-Dosis	LD_{50} mg/kg
6-AN	7,6	1,3	10
TCDD	2,3	3	0,04
Cycloph.	1,5	5	60 [b]
Dexam.	1,4	6	20
2,4,5-T	0,8	11	2000 ? [b]

a) Alle Substanzen wurden den Mäusen als einzelne Dosen am Tag 13 der Schwangerschaft gegeben (Auswertung der Daten in Abbildung 1).

b) 50%-Effekt wurde nicht im Versuch ermittelt, der Wert ist errechnet.

Abbildung 1: Dosis-Wirkungsrelation einiger Gaumenspalten induzierender Substanzen



Alle Pharmaka wurden am Tag 13 der Schwangerschaft verabreicht. TCDD und 2,4,5-T wurden, in Rapsöl gelöst, per Magensonde gegeben; 6-AN, Dexamethason und Cyclophosphamid wurden subcutan injiziert. Jeder Punkt gibt die Gaumenspaltenrate von mindestens 12 Würfen, in den niedrigen Dosen von 2o bis 3o Würfen, wieder. Die Daten sind als Prozentsatz aller mit der entsprechenden Dosis behandelten Feten angegeben. Die tan α-Werte der Dosis-Wirkungskurven sind in Tabelle 1 wiedergegeben, die von diesen Kurven abgeleiteten Schwellen-Dosen zeigt Tabelle 6.

a) 6-AN (6-Aminonicotinamid)

Die Phasenspezifität der teratogenen Wirkung wurde mit einer Dosis von 15 mg/kg für Tag 12 und Tag 13 ermittelt. An diesen beiden Tagen bewirkte 6-AN eine Gaumenspaltenrate von 100 % und signifikante und hochsignifikante Feuchtgewichtsreduktionen der Feten (s. Tab. 2). Signifikante Resorptionen traten erst bei einer Dosis von 15 mg/kg auf.

Die ermittelte "Schwellendosis" liegt bei 7 mg/kg. Die Dosis-Wirkungskurve in Abb. 1 zeigt eine bemerkenswerte Steilheit mit einem tan α von 7,6.

b) TCDD (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin)

Die Werte für die Einzelversuche mit TCDD haben wir wegen der hohen Toxizität des TCDD der Arbeit von NEUBERT und DILLMANN (1972) entnommen. Dort ergab sich die höchste Empfindlichkeit für den Tag 11 der Schwangerschaft, am Tag 10 und 12 entstanden etwa die Hälfte der Mißbildungen, am Tag 13 zeigte TCDD nur etwa ein Drittel der Wirkungen von Tag 11. Um die Substanz mit den anderen Teratogenen vergleichen zu können, haben wir trotzdem auch hier Tag 13 als Applikationszeitpunkt gewählt.

An den Werten der Dosis-Wirkungskurve kann man die hohe Toxizität des TCDD ablesen. Der "Schwellenwert" liegt mit 12 µg/kg extrem niedrig. Die Steigung der Kurve, tan $\alpha = 2{,}3$, ist jedoch nur mäßig steil.

Tabelle 2: Statistische Auswertung der Mißbildungsrate nach Behandlung der Muttertiere mit 6-Aminonikotinamid

Behandlung Dosis (mg/kg)	Tag	Implantationen / Würfe	Resorptionen / Implantat. (%)	Würfe mit Resorp. (%)	Resorptionen / Würfe m.Res.	Resorptionen einzeln. Wurf (M ± S.D.)	Feuchtgewicht (g)	(Δ)
-	-	2072/190= 10,9	82/2072= 4,0	46 = 24	82/46= 1,8	0,06 ± 0,09	1,26	± 0,15
7,5	13	396/33 = 12,0	22/396 = 5,6	16 = 48	25/16= 1,6	0,07 ± 0,10	1,18*	± 0,18
8,5	13	143/11 = 13,0	9/143 = 6,3	8 = 73**	9/8 = 1,1	0,08 ± 0,11	1,15*	± 0,17
10	13	69/ 7 = 9,8	5/ 69 = 7,2	4 = 57	5/4 = 1,3	0,07 ± 0,08	1,12*	± 0,20
12	13	76/ 7 = 10,8	3/ 76 = 3,9	2 = 29	3/2 = 1,5	0,05 ± 0,11	1,02**	± 0,11
13	13	79/ 7 = 11,3	7/ 79 = 8,9	4 = 57	7/4 = 1,8	0,11 ± 0,14	0,98**	± 0,15
15	13	47/ 4 = 11,7	6/ 47 =12,8**	3 = 75	6/3 = 2,0	0,11 ± 0,17	0,86**	± 0,15
15	12	84/ 7 = 12,0	3/ 84 = 3,6	2 = 29	3/2 = 1,5	0,05 ± 0,10	0,94**	± 0,13
15	14	190/15 = 12,7	7/190 = 4,1	5 = 33	7/5 = 1,4	0,04 ± 0,07	0,90**	± 0,15
15	15	37/ 3 = 12,3	2/ 37 = 5,4	1 = 33	2/1 = 2,0	0,12 ± 0,21	0,94**	± 0,17
15	16	18/ 2 = 9,0	2/ 18 =11,1	1 = 50	2/1 = 2,0	0,14 ± 0,20	0,92**	± 0,08
10	14	75/ 8 = 9,4	6/ 75 = 8,0	5 = 63*	6/5 = 1,2	0,09 ± 0,09	1,08*	± 0,15
20	14	44/ 8 = 8,8	8/ 44 =18,2**	6 = 75**	9/6 = 1,5	0,13 ± 0,11	1,02**	± 0,22

* = signifikant , ** = hochsignifikant

Tabelle 3: Statistische Auswertung der Mißbildungsrate nach Behandlung der Muttertiere mit 2,4,5-T bzw. TCDD

Behandlung Substanz	Dosis (mg/kg)	Tag	Implantationen / Würfe	Resorptionen / Implantat. (%)	Würfe mit Resorp. (%)	Resorptionen / Würfe m.Res.	Resorptionen / einzeln.Wurf (M ± S.D.)	Feuchtgewicht (g)	(Δ)
-	-	-	2072/190= 10,9	82/2072= 4,0	46= 24	82/46= 1,8	0,06 ± 0,09	1,26	± 0,15
2,4,5-T	150	13	203/18 = 11,2	7/203 = 3,0	7 = 39	7/7 = 1,0	0,03 ± 0,05	1,24	± 0,19
	250	13	83/ 7 = 11,8	5/ 83 = 6,0	3 = 43	5/3 = 1,7	0,09 ± 0,16	1,19	± 0,16
	300	13	121/10 = 12,1	10/121 = 8,3*	5 = 50	10/8 = 1,3	-	1,16*	± 0,14
+)	300	11	112/ 8 = 14,0	5/112 = 4,5	5 = 63*	5/5 = 1,0	-	1,22	± 0,14
+)	300	12	251/21 = 12,0	22/251 = 8,8**	13= 62**	22/13= 1,7	-	1,14*	± 0,14
+)	300	14	103/10 = 10,3	8/103 = 7,8	6 = 60	8/6 = 1,3	-	1,09*	± 0,24
+) TCDD µg/kg	45	9	59/ 6 = 9,8	3/ 59 = 5,1	3 = 50	3/3 = 1,0	-	1,21	± 0,11
	45	10	129/12 = 10,8	10/129 = 7,8	4 = 33	10/4 = 2,5	-	1,26	± 0,13
	45	11	137/14 = 9,8	14/137 =10,2**	10= 71**	14/10= 1,4	-	1,24	± 0,15
	45	12	73/ 7 = 10,4	6/ 73 = 8,2	4 = 57	6/4 = 1,5	-	1,24	± 0,11
	45	13	55/ 6 = 9,2	5/ 55 = 9,1	3 = 50	5/3 = 1,7	-	1,20	± 0,12
	45	14	73/ 7 = 10,4	4/ 73 = 5,5	3 = 43	4/3 = 1,3	-	1,20	± 0,11

* = signifikant , ** = hochsignifikant

+) = Diese Versuchsreihen wurden übernommen von NEUBERT und DILLMANN (1972)

c) 2,4,5-T (2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure)

Die Phasenspezifität wurde mit einer Dosis von 300 mg/kg von NEUBERT und DILLMANN (1972) mit einem Wirkungsmaximum (13 % Gaumenspalten) am Tag 12 ermittelt. Dort trat auch eine hochsignifikante Resorptionserhöhung auf, nicht aber an den Tagen 11, 13 und 14. Signifikante Feuchtgewichtsreduktionen traten an den Tagen 12, 13 und 14 auf (s. Tab. 3).

Die eigenen Versuche ergaben mit einer Dosis von 300 mg/kg am Tag 13 noch eine Gaumenspaltenrate von 7, 2 %.
Die recht hohe "Schwellen-Dosis" von 150 mg/kg zeigt die verhältnismäßig geringe Toxizität des 2,4,5-T, ebenso wie die Dosis-Wirkungskurve mit dem sehr flachen Anstieg von tan α = 0,8.
ED_{50} kann durch Versuche nicht ermittelt werden - errechnet wäre es die 11fache Menge der "Schwellen-Dosis" (nach NEUBERT und DILLMANN).

d) Cyclophosphamid (Endoxan^{R})

Bei Cyclophosphamid erwies sich Tag 13 als der günstigste Applikationszeitpunkt. Mit 40 mg/kg wurde eine Gaumenspaltenrate von 27 % erreicht, und es waren dosisabhängige signifikante und hochsignifikante Feuchtgewichtsreduktionen zu beobachten, jedoch keine signifikanten Resorptionen (s. Tab.4).

Tabelle 4: Statistische Auswertung der Mißbildungsrate nach Behandlung der Muttertiere mit Cyclophosphamid

Behandlung Dosis (mg/kg)	Tag	Implantationen / Würfe	Resorptionen / Implantat. (%)	Würfe mit Resorp. (%)	Resorptionen / Würfe m.Res.	Resorptionen / einzeln.Wurf (M ± S.D.)	Feuchtgewicht (g)	(Δ)
-	-	2072/190= 10,9	82/2072= 4,0	46 = 24	82/46= 1,8	0,06 ± 0,09	1,26	± 0,15
10	13	240/21 = 11,4	6/240 = 2,5	3 = 14	6/3 = 2,0	0,03 ± 0,06	1,25	± 0,10
15	13	211/18 = 11,7	5/211 = 2,4	3 = 17	5/3 = 1,7	0,03 ± 0,05	1,09*	± 0,13
20	13	183/15 = 12,2	5/183 = 2,7	4 = 27	5/4 = 1,3	0,03 ± 0,04	0,86**	± 0,08
30	13	66/ 5 = 13,2	3/ 66 = 4,5	2 = 40	3/2 = 1,5	0,05 ± 0,09	0,81**	± 0,09
40	13	106/10 = 10,6	7/106 = 6,6	4 = 40	7/4 = 1,8	0,07 ± 0,10	0,79**	± 0,11
20	14	119/11 = 10,8	3/119 = 2,5	2 = 18	3/2 = 1,5	0,03 ± 0,07	1,07**	± 0,11
20	15	90/ 8 = 11,2	2/ 90 = 2,2	2 = 25	2/2 = 1,0	0,02 ± 0,04	1,11*	± 0,10
20	16	108/10 = 10,8	6/108 = 5,6	5 = 50	6/5 = 1,2	0,06 ± 0,07	1,30	± 0,13

* = signifikant , ** = hochsignifikant

Der "Schwellenbereich" liegt bei 1o mg/kg, ED_{5o} bei 6o mg/kg. Dieser Wert ist jedoch nur errechnet, nicht durch Versuche ermittelt. Die Dosis-Wirkungskurve ist mit einem tan α von 1,5 recht flach.

e) Dexamethason (Fortecortin®)

Die Phasenspezifität wurde mit Dosen von 1o mg/kg und 3o mg/kg ermittelt. Die Wirkung ist außerordentlich eng auf den Tag 13 begrenzt, es ergaben sich signifikante Mißbildungen - bei 3o mg/kg 68 % Gaumenspalten und Feuchtgewichtsreduktionen von o,9 g. Bei 15 mg/kg am Tag 13 trat eine Resorptionserhöhung auf, die jedoch, da dosisunabhängig, nicht von Bedeutung ist (s. Tab. 5).

Der "Schwellenwert" liegt bei 2 mg/kg, die Dosis-Wirkungskurve zeigt eine relativ geringe Steigung von tan α = 1,5.

Tabelle 5: Statistische Auswertung der Mißbildungsrate nach Behandlung der Muttertiere mit Dexamethason

Behandlung Dosis (mg/kg)	Tag	Implantationen / Würfe	Resorptionen / Implantat. (%)	Würfe mit Resorp. (%)	Resorptionen / Würfe m.Res.	Resorptionen / einzeln.Wurf (M ± S.D.)	Feuchtgewicht (g)	(Δ)
-	-	2072/190= 10,9	82/2072= 4,0	46 = 24	82/46= 1,8	0,06 ± 0,09	1,26	± 0,15
2	13	153/15 = 10,0	5/153 = 3,3	5 = 33	5/5 = 1,0	0,04 ± 0,05	1,34	± 0,14
3	13	245/21 = 11,7	10/245 = 4,1	10 = 48	10/10= 1,0	0,05 ± 0,05	1,26	± 0,14
5	13	110/10 = 11,0	4/110 = 3,6	4 = 40	4/4 = 1,0	0,04 ± 0,05	1,22	± 0,11
7	13	116/ 9 = 12,9	5/116 = 4,3	4 = 44	5/4 = 1,3	0,06 ± 0,08	1,15*	± 0,22
10	13	111/ 9 = 12,3	7/111 = 6,3	5 = 55	7/5 = 1,4	0,08 ± 0,10	1,26	± 0,11
15	13	158/13 = 12,2	18/158 =11,4*	10 = 77*	18/10= 1,8	0,13 ± 0,10	1,27	± 0,15
30	13	89/ 7 = 12,7	5/ 89 = 5,6	2 = 29	5/2 = 2,5	0,07 ± 0,15	1,15*	± 0,19
10	12	95/ 8 = 11,9	6/ 95 = 6,3	5 = 62	6/5 = 1,2	0,07 ± 0,07	1,23	± 0,16
10	14	103/ 8 = 12,9	5/103 = 4,9	5 = 62	5/5 = 1,0	0,06 ± 0,05	1,22	± 0,11
30	14	73/ 7 = 10,4	5/ 73 = 6,8	3 = 43	5/3 = 1,7	0,14 ± 0,13	1,22	± 0,14
30	15	102/10 = 10,2	3/102 = 2,9	3 = 30	3/3 = 1,0	0,03 ± 0,06	1,26	± 0,11
30	16	201/18 = 11,2	8/201 = 4,0	5 = 28	8/5 = 1,6	0,04 ± 0,08	1,19	± 0,11

* = signifikant

Abbildung 2: Phasenspezifität der Auslösung von Gaumenspalten der in den Kombinationsversuchen verwendeten Substanzen

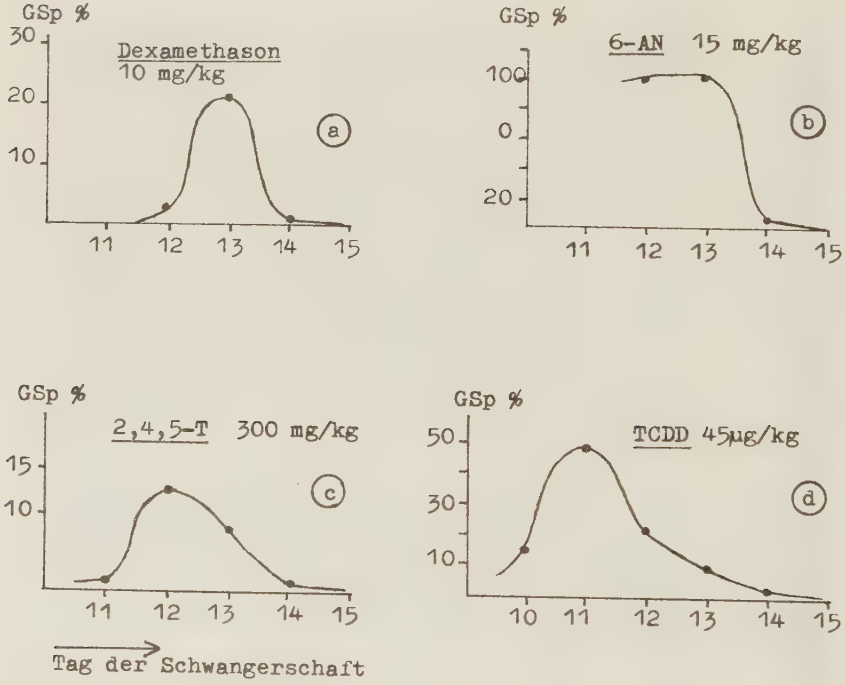
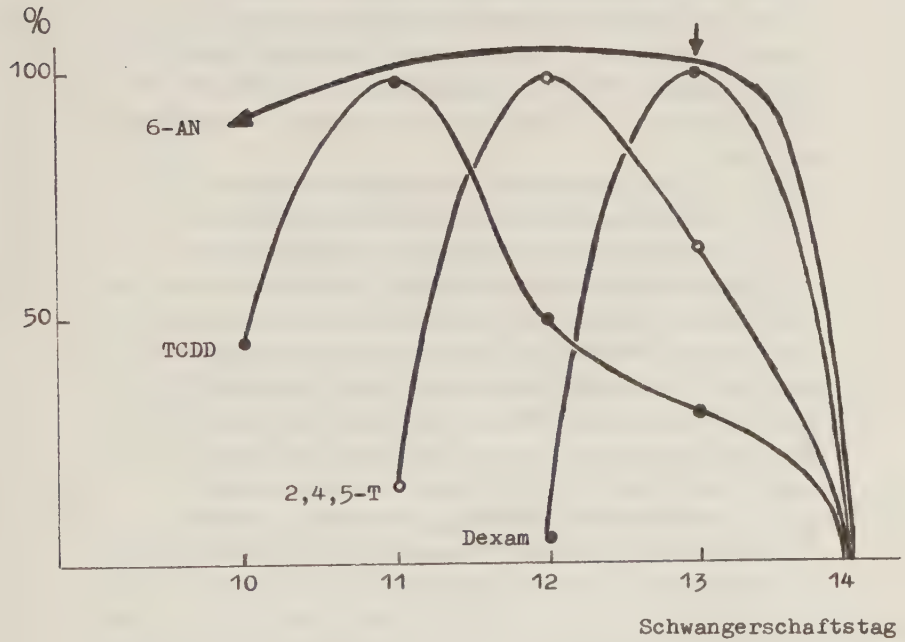


Abbildung 3: Phasenspezifitat der einzelnen Teratogene für die Entstehung von Gaumenspalten



Die Darstellung gibt einen groben Überblick über den optimalen Effekt der einzelnen Teratogene. Die einzelnen Punkte sind durch große Versuchsreihen an NMRI-Mausen ermittelt. 1oo% bedeutet Maximaleffekt, nicht Gaumenspaltenhäufigkeit. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt, an dem die Kombinationsversuche durchgeführt wurden. Nicht alle Teratogene zeigen an diesem Punkt ihren Maximaleffekt.

II. Kombinationsversuche mit jeweils drei, vier und fünf Teratogenen

Es wurden sechs Versuchserien durchgeführt, davon drei mit Dreifachkombinationen, zwei mit Vierfachkombinationen und eine mit Fünffachkombinationen. Zum gleichen Zeitpunkt hatte ROTHENWALLNER (1974) in unserem Labor Versuche mit Zweier-Kombinationen dieser Pharmaka durchgeführt.
Unsere Kombinationsversuche wurden mit drei verschiedenen definierten Dosen durchgeführt - es waren die "gerade teratogen wirksame Dosis", die etwa eine Gaumenspaltenhäufigkeit von 6 % hervorruft, die "gerade nicht teratogen wirksame Dosis" ("Schwellen-Dosis"), deren Effekt ungefähr der gerade noch nicht signifikanten Erhöhung der Gaumenspaltenrate gegenüber den Kontrollwerten entspricht, und eine "deutlich nicht teratogen wirksame Dosis", die ungefähr einer halben Schwellendosis gleichkommt. Die Versuchsergebnisse sind den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen.

1) Bei der Kombination von 6-AN (Schwellen-Dosis) und 2,4,5-T (Schwellen-Dosis) konnte ROTHENWALLNER (1974) zeigen, daß Gaumenspalten in 27 % der Feten auftreten. Es kommt also zu einer klaren Potenzierung. Wird zu dieser Zweier-Kombination noch zusätzlich Dexamethason in 1/2 Schw.-Dosis zugegeben, so fanden wir in eigenen Versuchen eine Gaumenspaltenhäufigkeit von 58 %, eine Resorptionsrate von 15,2 % und eine Gewichtsreduktion von o,25 g gegenüber den Kontrollwerten (hochsignifikant, s.Tab.7u.8).

2) Die Kombination von Dexamethason (1/2 Schw.-Dosis) und 6-AN (1/2 Schw.-Dosis) ergibt nach den Daten von ROTHENWALLNER (1974) keine gegenüber den Kontrollen erhöhte Gaumenspaltenrate. Zugabe von 2,4,5-T (Schwellendosis) ergab in eigenen Versuchen eine Gaumenspaltenhäufigkeit von 26 %; Resorptionen und Gewichtsreduktionen waren nicht signifikant von denen der Kontrollen verschieden.

3) Bei der Kombination von Dexamethason in 1/2 Schw.-Dosis und 6-AN in 1/2 Schw.-Dosis - die, wie in 2) beschrieben, wirkungslos ist - mit wirksamer Dosis TCDD (3o µg/kg, löst allein gegeben schon eine Gaumenspaltenhäufigkeit von 35 % aus) erzielten wir eine Häufigkeit dieser Mißbildungen von nur 51 % gegenüber den Kontrollwerten; Resorptionen und Feuchtgewichte waren jedoch nicht signifikant verändert.

4) Während bei einer Dreifach-Kombination von Dexamethason, 2,4,5-T und TCDD - alle in halber Schw.-Dosis - eine Gaumenspaltenhäufigkeit von unter 1o % resultiert, erzielten wir bei Zugabe einer halben Schw.-Dosis 6-AN als vierte Substanz eine Gaumenspaltenrate von 28 %; Resorptionen und Feuchtgewichte waren wiederum nicht signifikant verändert.

5) Bei der Vierfach-Kombination von jeweils halben Schw.-Dosen von Dexamethason, 6-AN und 2,4,5-T sowie einer Schw.-Dosis (12 µg/kg) TCDD erhöhte sich die Gaumenspaltenhäufigkeit auf 53 %; eine signifikante Feuchtgewichtsreduktion oder Vermehrung der Resorptionen waren nicht zu beobachten.

6) Bei einem Versuch mit einer Fünffach-Kombination gaben wir zusätzlich zu der unter 4) angegebenen Vierfach-Kombination (Dexam., 6-AN, 2,4,5-T und TCDD in halber Schw.-Dosis) noch Cyclophosphamid, ebenfalls in halber Schw.-Dosis. Die beobachtete Gaumenspalten-häufigkeit von 34 % unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der mit der Vierfach-Kombination erzeugten (28 %).
Auch Resorptionen und Feuchtsreduktionen waren nicht signifikant verändert.

Tabelle 6: In den Kombinationsversuchen verwendete Dosen [a]

	TCDD µg/kg	245-T mg/kg	6-AN mg/kg	Dexam mg/kg	Cycloph. mg/kg
"gerade teratogene" Dosis [b]	15	250	7,5	4	15
"gerade nicht teratogene" Dosis	12	150	7	2	10
"Schwellen-Dosis" als Bruch von ED_{50} [c]	1/3	1/13 [d]	7/1o	1/1o	1/6 [d]

a) Alle Dosen wurden von den Dosis-Wirkungskurven abgeleitet, deren Werte im Bereich der niedrigsten Dosen mit mindestens 3oo Feten erstellt wurden. Die Daten beziehen sich auf einzeitig am Tag 13 der Schwangerschaft verabreichte Dosen.

b) Die "gerade teratogene" Dosis ist die niedrigste Dosis, die unter experimentellen Bedingungen (bei uns 3oo-5oo Feten pro Dosis) einen gegenüber Kontrollen (2ooo Feten) signifikanten Effekt hervorruft.

c) Obwohl eine "Schwellen-Dosis" nicht exakt bestimmt werden kann, gebrauchen wir dennoch diese Bezeichnung, weil es die Auswertung der Kombinationsversuche erleichtert. In dieser Arbeit ist die Bezeichnung definiert als die höchste ermittelte Dosis, die unter unseren Versuchsbedingungen nicht imstande war, eine signifikante Erhöhung der Gaumenspaltenrate über den Kontrollwert zu bewirken.

d) ED_{50} wurde extrapoliert, da diese Dosis entweder toxisch für den Muttertierorganismus ist oder fetolethal wirkt.

III. Diskussion der Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse dieser Kombinationsversuche zeigen, daß alle geprüften Teratogene in Bezug auf die Gaumenspaltenhäufigkeit eine Potenzierung hervorrufen, zeigen jedoch keinen überadditiven Effekt für Resorptionen und Feuchtgewichtsreduktionen.
Die Potenzierung variiert jedoch; sie ist abhängig von der Steilheit der Dosis-Wirkungskurve der jeweiligen Teratogene und natürlich auch von der Höhe der Dosierung.
So ergeben z.B. die Kombinationen von halben Schwellen-Dosen mit Schwellen-Dosen, bzw. mit gerade wirksamen (aktiven) Dosen, häufig Gaumenspaltenraten von über 50 %, während Kombinationen ausschließlich mit halben Schwellen-Dosen "nur" Gaumenspaltenhäufigkeiten von höchstens 30 % zur Folge haben.

Die Abhängigkeit der Wirkung der einzelnen Teratogene vom tan α der Dosis-Wirkungskurve wurde von ROTHENWALLNER (1974) in den Zweifach-Kombinationen nachgewiesen. Dort ergeben die Kombinationsversuche eine direkte Proportionalität zwischen tan α -Werten und erzielter Gaumenspaltenrate. So bewirkt z.B. die Kombination von TCDD in halber Schwellen-Dosis mit 6-AN in halber Schwellen-Dosis eine Potenzierung, während TCDD in Zweierkombination in gleichen Dosen mit 2,4,5-T, Cyclophosphamid oder Dexamethason - alle drei Pharmaka mit niedrigem tan α - keine signifikanten Wirkungen hervorruft.

Kombiniert man jedoch eine halbe Schwellen-

Tabelle 7: Statistische Auswertung der Mißbildungsrate nach Behandlung der Muttertiere mit mehreren simultan applizierten Substanzen

Behandlung Substanzen	Dosis	Tag	Implantat. / Würfe	Resorptionen / Implantat. (%)	Würfe mit Resorp. (%)	Resorptionen / Würfe m.Res.	Resorptionen / einzel.Wurf (M ± S.D.)	Feuchtgew. (g)	(Δ)
-	-	-	2072/190=10,9	82/2072= 4,0	46=24	82/46=1,8	0,06±0,09	1,26	±0,15
Dexam.+6-AN + 2,4,5-T	1mg+3,5mg + 150mg	13	80/ 7=10,1	4/ 80=5,0	3=43	4/3 =1,3	0,06±0,07	1,28	±0,16
Dexam.+6-AN + 2,4,5-T	1mg +7mg + 150mg	13	125/12=10,4	19/125=15,2**	7=58*	19/7 =2,7	0,20±0,21	1,01**	±0,19
Dexam.+6-AN + TCDD	1mg+3,5mg + 30µg	13	142/12=10,2	9/142=6,3	9=75**	9/9 =1,0	0,07±0,05	1,35	±0,11
Dexam.+6-AN +2,4,5-T+TCDD	1mg+3,5mg +75mg+12µg	13	112/10=11,2	6/112=5,4	5=50	6/5 =1,2	0,06±0,07	1,11*	±0,19
Dexam.+6-AN +2,4,5-T+TCDD	1mg+3,5mg +75mg+6µg	13	92/8 =11,5	2/92 =2,2	2=25	2/2 =1,0	0,03±0,05	1,26	±0,11
Dexam.+6-AN +2,4,5-T+TCDD +Cyclophosph.	1mg+3,5mg +75mg+6µg + 5mg	13	190/16=11,9	7/190=3,7	4=25	7/4 =1,8	0,04±0,07	1,20	±0,15

* = signifikant , ** = hochsignifikant

Tabelle 8: Statistische Auswertung der Mißbildungsrate nach Behandlung der Muttertiere mit mehreren simultan applizierten Substanzen

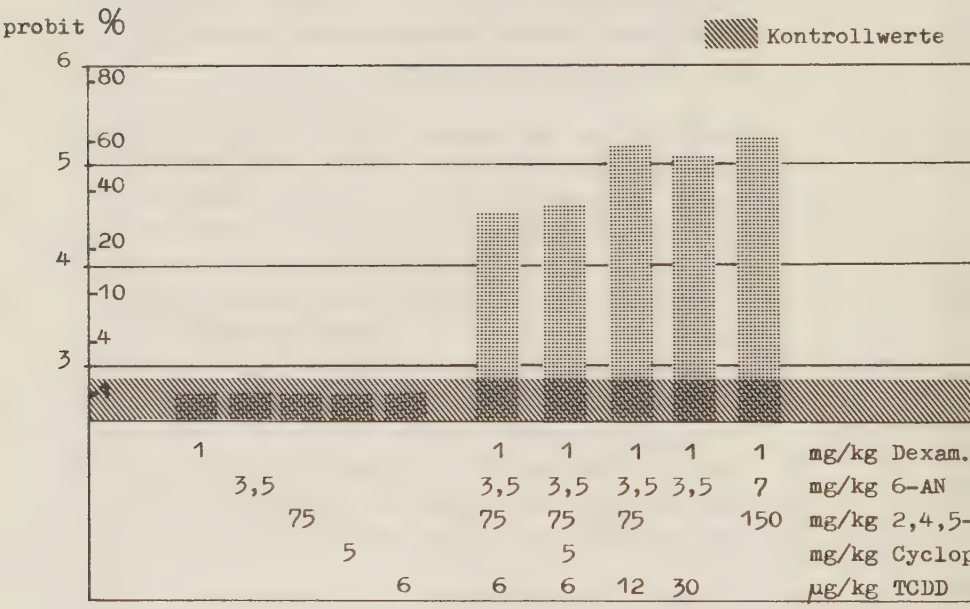
Behandlung			Implantationen / Würfe	lebende Feten / Wurf	Gaumenspalten / Feten (%)	Schwanger-schaften m. Gaumensp. (%)	Gaumen-sp./ einzelne Schwangersch. (M ± S.D.)
Substanzen	Dosis	Tag					
-	-	-	2072/190=10,9	1990/190=10,5	12/1990= 0,6	12= 6	0,07±0,28
Dexam.+6-AN + 2,4,5-T	1mg+ 7mg +150mg	13	125/12 =10,4	106/12 = 8,8	61/106 =57,5	10=83	0,55±0,38
Dexam.+6-AN + 2,4,5-T	1mg+3,5mg +150mg	13	80/7 =10,1	76/7 =12,7	20/76 =26,0	7=100	0,33±0,32
Dexam.+6-AN + TCDD	1mg+3,5mg +30µg	13	142/12 =10,2	133/12 =11,1	68/133 =51,1	12=100	0,52±0,34
Dexam.+6-AN +2,4,5-T+TCDD	1mg+3,5mg +75mg+12µg	13	112/10 =11,2	106/10 =10,6	56/106 =52,8	9=90	0,36±0,35
Dexam.+6-AN +2,4,5-T+TCDD	1mg+3,5mg +75mg+6µg	13	92/8 =11,5	90/8 =11,3	25/90 =27,8	8=100	0,30±0,25
Dexam.+6-AN +2,4,5-T+TCDD +Cyclophosph.	1mg+3,5mg +75mg+6µg +5mg	13	190/16 =11,9	183/16 =11,4	63/183 =34,4	13=81	0,33±0,29

Dosis TCDD als viertes Pharmakon mit halben Schwellen-Dosen 2,4,5-T, Dexamethason und 6-AN simultan, tritt eine Potenzierung von ungefähr 3o % auf, mit TCDD in Schwellen-Dosis (12 µg/kg) sogar eine Potenzierung von 53 %, während die Dreierkombination mit halben Schwellen-Dosen 6-AN, Dexamethason und 2,4,5-T ohne TCDD keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollwerten ergeben.

TCDD ist, in Mehrfachkombination mit wirksamen Dosen anderer Teratogene, in der Lage, selbst bei so geringer Dosis von 1/2o der Schwellen-Dosis Potenzierungen hervorzurufen (NEUBERT et al., 1973). Es ist jedoch noch nicht untersucht, ob TCDD z.B. in 1/1o der Schwellen-Dosis in Mehrfachkombination mit anderen Teratogenen eine Potenzierung bewirken kann.

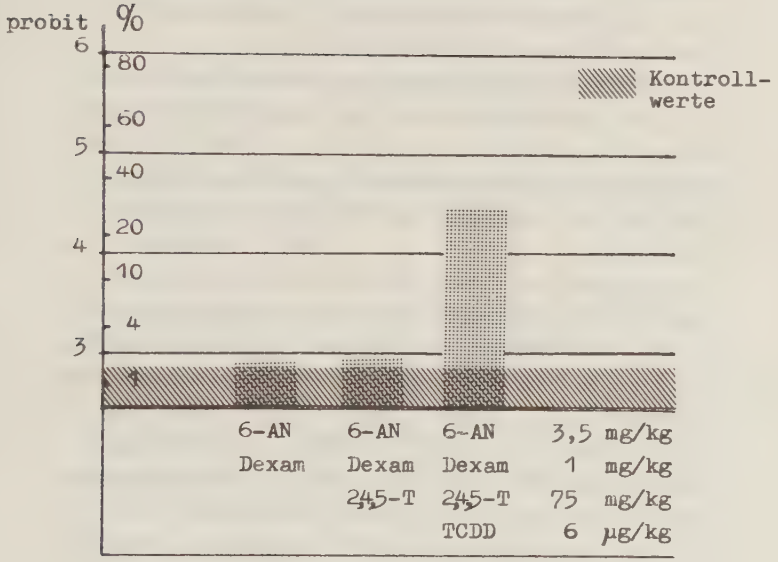
Es mag noch erwähnt werden, daß die hier angestellten Überlegungen nur dann gültig sind, solange der Stoffwechsel der Substanzen durch die Kombinationen nicht beeinflußt wird.

Abbildung 4: Gaumenspaltenhäufigkeit nach Pharmaka-Kombinationen



Alle Pharmaka-Kombinationen wurden einmalig simultan am Tag 13 der Schwangerschaft in den angegebenen Dosen verabreicht, TCDD und 2,4,5-T in Rapsöl gelöst durch die Magensonde, alle anderen subcutan.
Pro Gruppe wurden mindestens 12 Würfe ausgewertet, die Daten sind in Prozent aller pro Gruppe ausgewerteten Feten angegeben (Probit-Skala).

Abbildung 5: Gaumenspaltenhäufigkeit nach Pharmaka-Kombinationen



Die Versuchsbedingungen sind die gleichen wie in Abbildung 4. Es wurden ausschließlich Substanzen in halben Schwellen-Dosen kombiniert. Siehe dazu auch Tabelle 8.

F. Zusammenfassung

1) Die vorliegenden Untersuchungen dienten der Feststellung teratogener und anderer embryotoxischer Wirkungen kombiniert verabreichter Pharmaka. Versuchstiere waren Mäuse vom NMRI-Stamm, Indikatoren für embryotoxische Effekte waren Gaumenspaltenhäufigkeit, Resorptionen und Feuchtgewichtsreduktionen.

2)Die untersuchten Substanzen waren 6-AN, TCDD, 2,4,5-T, Cyclophosphamid und Dexamethason. Anhand von Einzeluntersuchungen wurden für jede Substanz die Schwellendosis, die Phasenspezifität und die Steigung der Dosis-Wirkungskurve ermittelt.

Die Phasenspezifität zeigte uns den günstigsten Applikationszeitpunkt für die Kombinationsversuche, der bei Cyclophosphamid, Dexamethason und 6-AN am Tag 13 der Schwangerschaft lag, bei TCDD am Tag 11, bei 2,4,5-T am Tag 12. Da TCDD und 2,4,5-T auch am Tag 13 signifikante Wirkungen zeigten, wurde dieser Tag als für alle Substanzen gemeinsamer Applikationstag festgelegt.

3) Die Kombinationsversuche, bei denen jeweils drei, vier und fünf verschiedene Substanzen simultan am Tag 13 der Schwangerschaft appliziert wurden, zeigen durchweg Potenzierungseffekte hinsichtlich der Gaumenspaltenrate. Resorptionen und Feuchtgewichtsreduktionen sind nur in einigen Fällen signifikant, bei den übrigen Versuchen sind sie unerheblich verändert.

Eine entscheidende Rolle spielt TCDD, da es in Kombinationen mit drei und vier anderen Substanzen, alle in halber Schwellendosis verabreicht, selbst in so geringer Menge von 6 µg/kg (1/2 Schw.-Dosis) deutliche Potenzierungseffekte hervorruft.

G. Literatur

1. Barrach, H.-J., Effect of 6-aminonicotinamide on the glucose metabolism of embryonic tissue. In Metabolic Pathways in Mammalian Embryos during Organogenesis and its Modification by Drugs, Freie Universität Berlin, 1970, p. 365

2. Barrach, H.-J., Inaugural Dissertation, Freie Universität Berlin, 1973

3. Batson, H.C., An Introduction to Statistics in the Medical Sciences, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1960

4. Chamberlain, J.G., Development of Cleft Palate Induced by 6-Aminonicotinamide Late in Rat Gestation. Anat. Record 156, 1966, p.31 - 40

5. Coper, H. und Neubert, D., Einfluß von NADP-Analogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit einiger NADP-bedürftiger Oxydoreduktasen. Biochem. Biophys. Acta, 89, 1964, 23 - 32

6. Courtney, K.D., Gaylor, D.W., Hogan, M.D., Falk, H.L., Bates, R.R., Mitchell, I.: Teratogenic Evaluation of 2,4,5-T, Science 168; 864-866, 1970

7. Courtney, K.D., and Moore, J.A.: Teratology studies with 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Toxicol. Appl. Pharamacol. 20:396, 1971

8. Fraser, F.C., Kalter, H., Walker, B.E., Fainstat, T.D.: The experimental production of cleft palate with cortisone and other hormons. Jour. cell. comp. Physiol. 43 (suppl.1) 1954, 237 - 59

9. Herken, H., Lange, K., and Kolbe, H.: Brains disorders induced by pharmacological blockade of the pentose phosphate pathway. Biochem. Biophys. Res. Communs. 36, 93-1oo, 1969

1o. Herken, H., and Lange, K.: Blocking of Pentose Phosphate Pathway in the Brain of Rats by 6-Aminonicotinamide. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 263, 496-499, 1969

11. Higginbotham, G.R., Huang, A., Firestone, D., Chemical and toxilogical evaluations of isolated and synthetic chloroderivates of dibenzo-p-dioxin. Nature 22o : 7o2-7o3, 1968

12. Hofmann, H.T.: Neuere Erfahrungen mit hochtoxischen Chlorkohlenwasserstoffen. Arch. Exp. Path. Pharmak. 232 : 228, 1957

13. Kimbrough, R.D.: Toxicity of Chlorinated Hydrocarbons and Related Compounds. Arch. Environ Health, Vol. 25, p. 125, Aug. 1972

14. Kimmig, J., und Schulz, K.H.: Chlorierte aromatische zyklische Äther als Ursache der sogenannten Chloracne. Naturwiss. 44 : 337, 1957

15. Köhler, E., und Neubert, D., Aktivität NADP-bedürftiger Oxydoreduktasen im embryonalen Gewebe der Ratte. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 26o, 154-156, 1968

16. Köhler, E., Barrach, H.J., und Neubert, D.: Inhibition of NADP dependent oxidoreductases by the 6-aminonicotinamide analogue of NADP. FEBS Letters 6 : no. 3.225, 197o

17. Neubert, D., Merker, H.-J., Köhler, E., Krowke, R., and Barrach, H.-J. in: Biochemical Aspects of Teratology. Advances in the Biosciences, Vol. 6, Pergamon Press-Vieweg, Braunschweig, p. 575-622, 1971

18. Neubert, D., und Dillmann, I., Embryotoxic effects in mice treated with 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Arch. Pharmakol. 272, 243, 1972

19. Neubert, D., Merker, H.-J., Zens, P., Rothenwallner, A.: A Survey of the Embryotoxic Effects of TCDD in Mammalian Species. Environmental Health Perspectives, Sept. 1973, pp. 67-79

2o. Pätau, K.: Zur statischen Beurteilung von Messreihen (eine neue t-Tafel). Biol. Zbl. 63:152, 1943

21. Poland, A.P., Smith, D., Metter, G., Possick, P.: A Health Survey of Workers in a 2,4-D and 2,4,5-T Plant. With Special Attention to Chloracne, Porphyria Cutanea Tarda and Psychologic Parameters.

Arch. Environ. Health, Vol. 22, p. 316, March 1971

22. Roll, R., Untersuchungen über die teratogene Wirkung von 2,4,5-T bei Mäusen. Fd.Cosm.Toxicol.1971

23. Rothenwallner, A.: Die Auslösung von Gaumenspalten durch simultane Applikation zweier Teratogene bei Mäusen. Dissertation, Freie Universität, Berlin, 1974

24. Schwetz, B.A., Norris, J.M., Sparschu, G.L., Rowe, V.K., Gehring, P.G., Emerson, J.L., Gerbig,C.G. Toxicology of chlorinated dibenzo-p-dioxins. Environ Health Perspect. No. 5 : 87, 1973

25. Sparschu, G.L., Dunn, F.L., Rowe, V.K. Teratogenic study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. Toxicol.Appl.Pharmakol. 17 : 317, 197o

26. Sparschu, G.L., Dunn, F.L., Rowe, V.K. Study of the teratogenecity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. Food Cosmet. Toxicol. 9 : 4o5, 1971

27. Teleky. Die Pernakrankheit (Chloracne). Klin. Woschr. 6 : 845, 1927, ibid., 6 : 897, 1927 ibid., 7 : 214, 1928

28. Walker, B.D., Fraser, F.C., Closure of the secondary palate in three strains of mice. J. Embryol. exp. Morph. 4, 176-189, 1956

29. Walker, B.E., Fraser, F.C. The Embryology of Cortisone-induced Cleft Palate. J.Embryol. exp. Morph. 5, 2o1-2o9, 1957

30. Wilson, J.G., Boutwell, R.K., Davis, D.E., Dost, F.N., Hayes, W.J., Sterling, Th.D. FDA-Report: Report of the Advisory Committee on 2,4,5-T to the Administrator of the Environmental Protection Agency, May 1971

LEBENSLAUF

Name: Zens, Peter
geb.: 29. 6. 45 in Schwarzenborn
Eltern: Dr. Franz-Josef Zens und Marie-Jeanne, geb. Oechsner

Schulbesuch:

1951 - '53 Bonn
1953 - '55 Holländische Schule, Den Haag
1955 - '60 Deutsche Schule, Den Haag
1960 - '63 Friedrich-Ebert-Gymn., Bonn
1963 - '67 Deutsche Schule, Brüssel, dort
24. 6. '67 Reifeprüfung

Studium:

1968 - '74 Studium der Zahn- und Humanmedizin an der Freien Universität, Berlin
5. 4. '71 zahnärztliche Vorprüfung
6. 9. '72 ärztliche Vorprüfung
19. 3. '74 Bestallung als Zahnarzt

seit 1.8.'74 Wiss. Angestellter an der Zahnklinik der Rhein.Friedr.-Wilhelms-Universität Bonn